



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12N 13/00, 15/87, C12M 3/00, 1/42</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/37628</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. Juni 2000 (29.06.00)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/10277</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 21. Dezember 1999 (21.12.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 59 459.3 22. Dezember 1998 (22.12.98) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): EVOTEC BIOSYSTEMS AG [DE/DE]; Schnackenburgallee 114, D-22525 Hamburg (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MÜLLER, Torsten [DE/DE]; Harriegelstrasse 39, D-12439 Berlin (DE). SCHNELLE, Thomas [DE/DE]; Koppenstrasse 65, D-10243 Berlin (DE). SHIRLEY, Stephen, Graham [GB/GB]; Victoria Main Street, Brandon, Warks CV8 3HW (GB). FUHR, Günter [DE/DE]; Kavalierstrasse 15, D-13187 Berlin (DE). GRADL, Gabriele [DE/DE]; Thomasiusstrasse 8, D-10557 Berlin (DE).</p> <p>(74) Anwalt: HERTZ, Oliver; V. Bezold & Sozien, Akademiestrasse 7, D-80799 München (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.</p>

(54) Title: MICROSYSTEM FOR CELL PERMEATION AND CELL FUSION

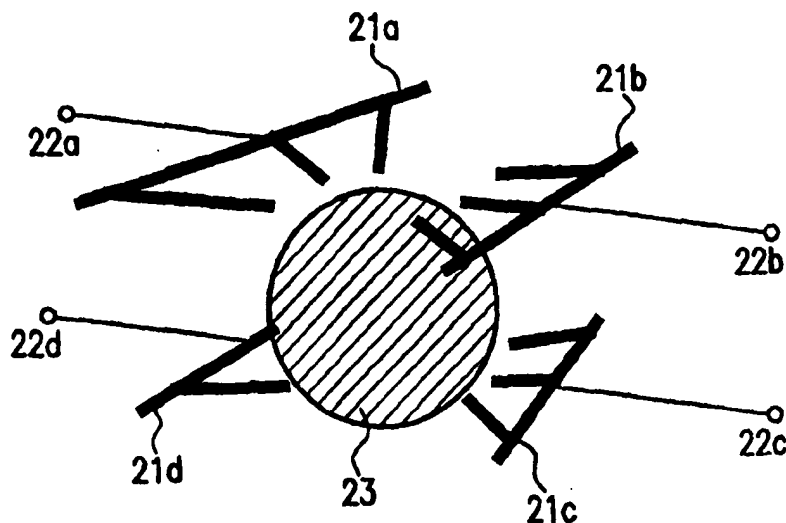
(54) Bezeichnung: MIKROSYSTEME ZUR ZELLPERMEATION UND ZELLFUSION

(57) Abstract

According to the invention, electroporation and/or fusion treatment of microscopic objects is effected in a medium between at least two electrodes, wherein said electrodes are miniaturized electrodes in a microsystem with a channel structure for the flow of the medium containing said objects.

(57) Zusammenfassung

Eine Elektroporations- und/oder Fusionsbehandlung mikroskopischer Objekte erfolgt in einem Medium zwischen mindestens zwei Elektroden, wobei die Elektroden miniaturisierte Elektroden in einem Mikrosystem mit einer Kanalstruktur sind, die zum Durchfluß des Mediums mit den Objekten eingerichtet ist.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Mikrosysteme zur Zellpermeation und Zellfusion

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Manipulierung und Bearbeitung biologischer Objekte mittels elektrischer Pulse, insbesondere zur Permeation (Poration) und/oder Fusion von Zellen oder von synthetischen, membranumhüllten Gebilden wie Liposomen oder Vesikeln, oder zur Permeation von Membran- oder Schichtmaterialien in miniaturisierten Elektrodenstrukturen, und Manipulierungs- oder Bearbeitungsverfahren unter Verwendung einer derartigen Vorrichtung.

Für bestimmte biotechnologische, medizinische oder gentechnische Aufgaben ist die kurzzeitige und reversible Erhöhung der Durchlässigkeit der Umhüllung lebender, in einer Flüssigkeit suspendierter Zellen von Interesse (Übersicht in "Elektromanipulation of Cells", U. Zimmermann, G.A. Neil, CRC, 1996). Neben chemischen, virusbasierten und laserinduzierten Permeationsmethoden hat sich wegen der Einfachheit und Definiertheit der Applikation die Permeation mittels kurzer elektrischer Pulse (Elektroporation oder Elektropermeation) entwickelt, wobei gepulste Gleichstromsignale (s. U. Zimmermann et al. in "BBA", Band 641, 1982, S. 160 ff.) oder gehopperte HF-Felder (s. PCT/US88/03457) verwendet werden. Bei den bisher allgemein bekannten, kommerziell verfügbaren Elektroporationsgeräten werden die Elektroporationen und/oder Fusionen in Kammern mit Elektroden durchgeführt, deren Dimensionen wesentlich größer als die Dimensionen der behandelten Objekte sind, wobei die folgenden Nachteile auftreten.

Zellen können bisher nicht in Kulturmedien permeiert werden, da diese eine hohe Leitfähigkeit besitzen und aufgrund der niedrigen Dielektrizitätskonstante und Leitfähigkeit biologischer Zellen das elektrische Feld außerhalb der Zellen verlau-

fen würde. Außerdem würden die Kulturmedien zu einer hohen thermischen Belastung der zu behandelnden Zellen durch Widerstandsheizungen aufgrund des Stromflusses durch das Kulturmedium führen. Der Anwendungsbereich der herkömmlichen Elektroporationsgeräte ist ferner auf robuste und widerstandsfähige Zellen beschränkt. Außerdem ist eine Optimierung der Fusionsparameter wie z.B. der Feldstärke und der Pulsfrequenz nur eingeschränkt möglich. Dies ergibt sich aus der Größenabhängigkeit des maximal induzierten Transmembranpotentials V_M^{\max} einer sich in einem externen elektrischen Feld E befindlichen Zelle (Radius R) gemäß $V_M^{\max} = 1,5 \cdot R \cdot E$ und der praktischen Größenvarianz biologischer Objekte. Dies ist insbesondere dann problematisch, wenn unterschiedliche Zelltypen gleichzeitig permeiert bzw. fusioniert werden sollen oder nur wenige Ausgangszellen zur Verfügung stehen. Schließlich erlauben die herkömmlichen Elektroporationsgeräte keine zuverlässige Einzelzellmanipulation oder -permeation.

Es ist ferner allgemein bekannt, daß sich biologische Objekte auf der Grundlage negativer oder positiver Dielektrophorese mit hochfrequenten elektrischen Feldern manipulieren lassen. Dies wird insbesondere in Mikrosystemen realisiert, wie es beispielsweise von G. Fuhr et al. in "Naturwissenschaften", Band 81, 1994, Seiten 528 ff. beschrieben ist. So zeigen bei einer üblichen Lösungsmittelleitfähigkeit von rund 0.3 S/m biologische Zellen unter der Wirkung hochfrequenter elektrischer Felder über einen großen Frequenzbereich von rd. 1 MHz bis über 120 MHz negative Dielektrophorese, d.h. die Zellen werden von mit den Hochfrequenzfeldern beaufschlagten Elektroden zu Gebieten niedriger Feldstärke bewegt. In Kulturmedien mit Leitfähigkeiten über 1 S/m zeigen tierische Zellen über alle Frequenzen negative Dielektrophorese.

Aus JP 60-251876 ist eine Einrichtung zur Zellfusion bekannt, bei der biologische Zellen unter der Wirkung elektrophoretischer

scher Kräfte zwischen planaren Elektroden angeordnet und mittels Hochspannungsbehandlung fusioniert werden. Die Elektroden befinden sich an den Kanalwänden eines Mikrosystems. Zur Fusion werden die Zellen auf den Elektrodenoberflächen festgesetzt. Das Mikrosystem besitzt derart geringe Dimensionen, daß sich die auf gegenüberliegenden Elektroden angeordneten Zellen gegenseitig berühren. Diese Fusionstechnik besitzt mehrere Nachteile. Die Positionierung der Zellen auf den Elektroden und ihre rückstandsfreie Entfernung nach der Fusion sind schwierig und zeitaufwendig. Eine bestimmte Kanalstruktur kann immer nur für eine bestimmte Zellgröße verwendet werden. Die Fusion ist nicht reproduzierbar, da sich zwischen den Elektroden gegebenenfalls mehrere Zellen ansammeln.

Aus JP 63-152971 ist ein Durchflußsystem zur Zellfusion und zur Nukleinsäureübertragung bekannt, bei dem an zwei Wänden einer Durchflußkammer Elektrodenplatten angebracht sind. Die Elektrodenplatten können anwendungsabhängig mit Gleich- und Wechselspannungen beaufschlagt werden, um Zellen, die durch die Durchflußkammer gespült werden, einer elektrischen Behandlung zu unterziehen. Die Durchflußkammer dieses Systems ist manuell demontierbar. Sie besitzt eine Größe, die erheblich größer als die zu behandelnden Zellen ist, und damit die gleichen Nachteile wie die obengenannten herkömmlichen Elektroporationsgeräte mit geschlossenen Kammern (ohne Durchfluß). Im Durchflußsystem ergibt sich ein weiterer Nachteil durch die unreproduzierbare, undefinierte Position der zu behandelnden Objekte. Dementsprechend können auch keine reproduzierbaren Fusionsergebnisse erzielt werden.

Es ist die Aufgabe der Erfindung, eine verbesserte Vorrichtung zur Manipulierung oder Bearbeitung (insbesondere durch Permeation) mikroskopischer Objekte zu schaffen, deren Anwendungsbereich in Bezug auf die Auswahl der Umgebungs- oder Kultur-

medien, die Optimierung der Porationsparameter und/oder die Handhabung kleinster Objektmengen (bis hin zu Einzelobjekten) erweitert ist. Die Erfindung soll insbesondere ermöglichen, eine reproduzierbare Manipulierung bzw. Bearbeitung, z.B. entsprechend einem definierten Protokoll und gegebenenfalls unter Gewährleistung einer freien Beobachtbarkeit, durchzuführen. Die Aufgabe der Erfindung besteht auch darin, ein verbessertes Elektroporationsverfahren unter Verwendung einer derartigen Vorrichtung anzugeben.

Diese Aufgaben werden durch eine Vorrichtung, ein Elektroporationsgerät bzw. ein Verfahren mit den Merkmalen entsprechend den Patentansprüchen 1, 8, 9 bzw. 13 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

Die Grundidee der Erfindung besteht darin, von den herkömmlichen, makroskopischen Elektroporationsanordnungen zu Mikrosystemen überzugehen, bei denen die Objektbehandlung als Behandlung frei suspendierter Teilchen in Umgebungs- oder Kulturmedien zwischen miniaturisierten Elektroden stattfindet. Gemäß einem ersten wichtigen Aspekt der Erfindung sind die Elektroden in einem Mikrosystem mit einer Kanalstruktur vorgesehen. Im Unterschied zur herkömmlichen Elektroporation in geschlossenen Küvetten ist die Kanalstruktur als Durchflußsystem eingerichtet. Die zu behandelnden Objekte werden somit vom strömenden oder fließenden Medium zu den Elektroden geführt und beim Durchfluß oder während eines zeitlich begrenzten, ortsfesten dielektrophoretischen Positionierens der Objekte in Bezug auf die Elektroden permeiert. Während der elektrischen Behandlung der Objekte besitzen diese in der freien Suspension einen Abstand von den Elektroden. Die Behandlung erfolgt in Bezug auf die Elektroden und/oder Wände des Mikrosystems berührungsfrei. Gemäß einem zweiten wichtigen Aspekt der Erfindung werden die Objekte mit einem derart geringen Abstand von

den Elektroden permeiert, daß selbst in hochleitfähigen Medien eine Permeation erfolgen kann. Im Mikrosystem sind Elektroden zur Ausübung von Polarisationskräften auf der Grundlage negativer Dielektrophorese und Elektroden zur Elektroporation vorgesehen.

Gemäß einem dritten wichtigen Aspekt der Erfindung sind Elektroden vorgesehen, die eine Doppelfunktion erfüllen. Eine erfindungsgemäße Vorrichtung weist z.B. ein Elektrodensystem auf, das simultan zur Halterung der Objekte im Medium oder zur Führung der Objekte in einem strömenden Medium, sowie zur Beaufschlagung der Objekte mit elektrischen Feldern zur Realisierung der Elektroporation eingerichtet ist. Im Unterschied zu herkömmlichen Elektroporationsgeräten bilden die Elektroden erfindungsgemäß einen mindestens in zwei zueinander senkrechten Raumrichtungen geschlossenen Käfig, in dem die Objekte manipuliert und der Elektroporation ausgesetzt werden. Die Elektroden sind zur Erzeugung eines inhomogenen elektrischen Feldes im Kanal eingerichtet, das ein sich in Strömungsrichtung lang erstreckendes Minimum aufweist. Die zu behandelnden Objekte werden mit den sich in Kanalrichtung durchgehend oder mit Unterbrechungen angeordneten Elektroden, die gleichzeitig Fokussierungs- und Porationselektroden sind, im Feldminimum gehalten.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Elektrodensystem so eingerichtet, daß die Poration der Objekte entsprechend vorbestimmter Porationsmuster erfolgt. Hierzu besitzen die Elektroden (Pulselektroden) feldformende Einrichtungen wie z.B. Elektrodenspitzen, die entsprechend den gewünschten Porationsmustern angeordnet sind, oder Abschirm- oder Abdeckelemente, die ein Freiliegen der Elektroden in Bezug auf das Medium mit dem oder den Objekten entsprechend dem gewünschten Porationsmuster erlauben.

Eine erfindungsgemäße Vorrichtung wird vorzugsweise als Mikrosystem mit Kanalstrukturen aufgebaut, die in mindestens einem Bereich mit einem erfindungsgemäßen Elektrodensystem ausgestattet sind (Elektroporationsbereich). Vorteilhafterweise werden derartige Elektroporationsbereiche im Mikrosystem mit anderen Bereichen zur Behandlung oder Manipulierung der Objekte z.B. zum Sammeln oder Trennen bestimmter Objekttypen (Manipulationsbereich) kombiniert. Erfindungsgemäße Mikrosysteme werden vorzugsweise als Durchflußsysteme betrieben.

Die Erfindung besitzt die folgenden Vorteile. Erfindungsgemäße Vorrichtungen erlauben Objektpermeationen in physiologischen Lösungen. Somit wird die Anwendbarkeit der Elektroporation auf Medien mit hoher Leitfähigkeit (z.B. im Bereich von 0.01 bis 10 S/m) erweitert. Es wird erstmalig eine zuverlässige, berührungsfreie und schonende Permeation einzelner Objekte oder Objektgruppen in freier Lösung ermöglicht. Die Miniaturisierbarkeit des Systems erlaubt eine Erhöhung der Elektrodenhaltbarkeit und eine Verringerung der Elektroporations-Pulsamplituden (bis in den Volt- bis 100V-Bereich), wobei dennoch die erforderlichen hohen Feldstärken erzielbar sind. Es wird erstmals ermöglicht, die zu behandelnden Objekte simultan an mehreren Stellen entsprechend vorbestimmten definierten Porationsmustern zu behandeln. Es wird eine Kombination der bisher auf makroskopische Anwendungen beschränkten Elektroporationstechnik mit Verfahrensweisen der Mikrosystemtechnik ermöglicht. Die erfindungsgemäße Objektbehandlung erfolgt berührungslos. Beschränkungen in Bezug auf die Anpassung des Mikrosystems an eine bestimmte Objektgröße sind ausgeschlossen. Außerdem erfolgt die Objektbehandlung rückstandsfrei. Verunreinigungen der Elektroden werden vermieden.

Weitere Vorteile bestehen in der erhöhten Effizienz und Ausbeute der Elektroporation, der verminderten Wärmeproduktion durch Minimierung der Elektrodenoberfläche, der Möglichkeit

der Permeation unterschiedlich großer Objekte und der zeiteffektiven Permeation von Objekten in Durchflußsystemen bei niedrigen Spannungen.

Die Erfindung ist nicht auf biologische Zellen beschränkt, sondern kann entsprechend mit allen interessierenden synthetischen, membranumhüllten Gebilden wie Liposomen oder Vesikeln oder mit Membran- oder Schichtmaterialien implementiert werden.

Weitere Vorteile und Einzelheiten der Erfindung werden im folgenden unter Bezug auf die beigegefügtten Zeichnungen erläutert.
Es zeigen:

Fig. 1A, 1B zwei Ausführungsformen von Elektrodensystemen in
erfindungsgemäßen Vorrichtungen in schematischer
Perspektivansicht,

Fig. 2A, 2B zwei weitere Ausführungsformen von Elektroden-
systemen in schematischer Perspektivansicht,

Fig. 3 eine weitere Ausführungsform eines Elektroden-
systems mit planaren, strukturierten Elektroden.

Fig. 4, 5 schematische Darstellungen zur Illustration des Feldlinienverlaufs bei der Elektroporation,

Fig. 6 eine schematische Perspektivansicht zur Illustration erfindungsgemäßer feldformender Einrichtungen am Elektrodensystem,

Fig. 7 eine schematische Darstellung eines Mehrkanal-Mikrosystems, das zur erfindungsgemäßen Poration von Objekten unterschiedlicher Größe eingerichtet ist,

- Fig. 8 eine schematische Darstellung eines erfindungsgemäßen Elektroporators mit Durchflußbetrieb,
- Fig. 9 schematische Darstellungen weiterer Elektrodenformen für dreidimensionale Anordnungen von Elektrodensystemen,
- Fig. 10 schematische Darstellungen zur Illustration der Kombination von Porations- und Manipulierungsbereichen in erfindungsgemäßen Mikrosystemen, und
- Fig. 11 eine weitere Ausführungsform eines Elektroden-systemen in schematischer Draufsicht,

Die folgende Erläuterung bezieht sich insbesondere auf die Elektrodengestaltung und -beschaltung in erfindungsgemäßen Vorrichtungen. Einzelheiten der Herstellung von Mikrosystemen mit halbleitertechnologischen Mitteln, der Kombination von Mikrosystemen mit Probenzufuhr- oder Detektionssystemen, der Erzeugung der Hochfrequenzfelder zur Dielektrophorese und der Gestaltung der Permeationspulse werden nicht im einzelnen erläutert, soweit diese an sich aus den herkömmlichen Techniken bekannt sind und in analoger Weise bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung übernommen werden können. Bei den folgenden Darstellungen wird in der Regel ein rundes Objekt gezeigt, das stellvertretend für die obengenannten, zu behandelnden Objekte dargestellt wird. Der Schwerpunkt der folgenden Erläuterung liegt bei der Elektroporation in Durchflußsystemen. Hierbei wird der Elektroporationsbereich der erfindungsgemäßen Vorrichtung von einem Medium (Umhüllungs- oder Kulturmedium) mit den zu behandelnden Objekten durchströmt, wobei miniaturisierte Elektroden Feldbarrieren in Richtungen senkrecht zur Strömungsrichtung (zweidimensionale Feldkäfige) bilden. Die Erfin-

dung ist entsprechend in stationären Systemen insbesondere mit dreidimensionalen Feldkäfigen implementierbar.

Die Fign. 1A, 1B zeigen beispielhafte Ausführungsformen von Elektrodensystemen von Durchflußanordnungen erfindungsgemäßer Vorrichtungen. In Mikrosystemen mit Kanalstrukturen (beispielsweise halbleitertechnologisch prozessierte Kanäle in Si-Chips) sind jeweils zwei der zum Elektrodensystem gehörenden vier Elektroden an der oberen bzw. unteren Kanalbegrenzung (Deckel bzw. Boden) angebracht. Die perspektivischen Darstellungen zeigen die Elektroden 11a und 11b als obere Elektroden und die Elektroden 11c und 11d als untere Elektroden. Die nicht dargestellten Kanalbegrenzungen sind vorzugsweise ebene Halbleiteroberflächen im Chip, auf denen die Elektroden mit geeigneten Depositionsverfahren gebildet sind. Es ist hervorzuheben, daß die Elektroden im wesentlichen schichtförmig auf den Kanalbegrenzungen aufgebracht sind und somit nicht bzw. nur geringfügig in den Kanal hineinragen. Gesonderte seitliche Kanalbegrenzungen zwischen den oberen Elektroden einerseits und den unteren Elektroden andererseits sind aufgrund der Feldkäfigfunktion des Elektrodensystems nicht erforderlich. Das Elektrodensystem ist zur Ausbildung elektrischer Feldbarrieren auf der Grundlage negativer Dielektrophorese zwischen den Objekten 13 und den oberen bzw. unteren Kanalbegrenzungen bzw. den sich seitlich anschließenden Kanalräumen eingerichtet. Die Feldbarrieren bilden zusammen ein Feldminimum, das sich in Kanallängsrichtung erstreckt.

Im Unterschied zu herkömmlichen Elektroporationskammern werden erfindungsgemäß mindestens zwei (vorzugsweise vier oder mehr) Elektroden dreidimensional in einem Kanal angeordnet. Die Objekte 13 (z.B. biologische Zellen) werden durch eine Medienströmung oder eine andere Kraft (Pfeilrichtung in Fig. 1A) durch das Elektrodensystem geführt und auf der Grundlage negativer Dielektrophorese von den Elektroden weg in den Zentral-

bereich des Kanals gedrückt. Zur Erzielung bestimmter Bewegungsabläufe können die Elektroden 11a-11d bandartig verschieden gestaltet sein, so z.B. kurvenförmig (Fig. 1A) oder gerade (Fig. 1B).

Das Elektrodenmaterial wird anwendungsabhängig gewählt und besteht vorzugsweise aus Platin, Titan, Tantal oder Legierungen aus diesen. Die Dicke der Elektrodenbänder liegt im μm -Bereich und ist vorzugsweise $< 1 \mu\text{m}$. Charakteristische Kanalquerschnitte liegen im Bereich von rd. $1 \mu\text{m}$ bis $100 \mu\text{m}$.

Die Elektroden 11a-11d sind jeweils entsprechend mit elektrischen Steuerleitungen 12a-12d verbunden. Die Steuerleitungen führen zu einer (nicht dargestellten) Steuereinrichtung, die einen Hochfrequenzgenerator zur Erzeugung der Hochfrequenzfelder für die negative Dielektrophorese und einen Pulsgenerator zur Erzeugung der Permeationspulse enthält. In diesem Fall funktionieren die Elektroden simultan als Hochfrequenz- und Pulselektroden.

Beim erfindungsgemäßen Betrieb werden die zu behandelnden Objekte 13 mit dem Medium durch den Kanal mit dem Elektroden-System 11a-11d geführt. Das Elektroden-System wird simultan mit HF-Spannungen (Bereich z.B. 1 MHz bis über 120 MHz) und Permeationspulsen (Dauer μs -Bereich, Amplitude bis 100 V) beaufschlagt. Die Objekte werden somit in den Zentralbereich des Kanals gedrückt, wo die Permeationspulse wirken, die zu einer reversiblen Öffnung der Zellmembran führen. Die gleichzeitige Nutzung des Elektroden-Systems für beide Funktionen stellt einen besonderen und bei der früheren Betrachtung herkömmlicher Elektroporationsgeräte und Mikrosysteme nicht erwarteten Vorteil dar. Es kann auch ein quasikontinuierlicher Durchflußbetrieb vorgesehen sein, bei dem eine Gruppe der zu behandelnden Objekte mit dem Suspensionsmedium in das Elektroden-

system geführt und dort unter Nutzung dielektrophoretischer Kräfte festgehalten wird. Anschließend erfolgt die Objektbehandlung (Elektroporation, Fusion oder dgl.) für alle Objekte unter definierten Bedingungen gleichzeitig. Danach werden die dielektrophoretischen Kräfte, die die Objekte im Elektrodensystem gehalten haben, freigegeben. Die Objekte strömen im Mikrosystem weiter.

Die in Kanalströmungsrichtung wirksame Länge der Elektroden 11a-11d kann anwendungsabhängig verschieden ausfallen bzw. dazu eingerichtet sein, daß mehrere Objekte 13 (Fig. 1A) gleichzeitig, aber räumlich getrennt im Elektrodensystem permeiert werden.

Ein besonderer Vorteil der Erfindung, nämlich die Bereitstellung vorbestimmter Porationsmuster, wird im folgenden unter Bezug auf die Fig. 2A, 2B erläutert, die zwei Ausführungsformen mit Elektrodensystemen zeigen, die mit feldformenden Einrichtungen versehen sind. Die Elektrodensysteme bestehen aus den Elektroden 21a-21d mit den entsprechenden elektrischen Steuerleitungen 22a-22d und feldformenden Elektrodenelementen 25 und 26. In Fig. 2A ist aus Übersichtlichkeitsgründen wie bei Fig. 1A, 1B nur das Elektrodensystem und das Objekt 23 ohne die Kanalbegrenzungen und ohne andere Teile des Mikrosystems dargestellt. In Fig. 2B sind lediglich die feldformenden Elemente (oder separaten Elektroden) 25a-25j, 26a-26j, das Objekt 23 und zur Verdeutlichung die Ebenen der oberen bzw. unteren Kanalbegrenzung 27, 28, nicht jedoch ggf. vorhandene, die Elemente in Gruppen verbindende Elektrodenbänder bzw. die elektrischen Steuerleitungen dargestellt.

Die feldformenden Elemente 25, 26 sind Elektrodenstrukturen, die sich band- oder linienförmig auf der jeweiligen Kanalbegrenzungsoberfläche hin zur Kanalmitte erstrecken. Die Längs-

dimension hin zur Kanalmitte wird derart gewählt, daß die Enden der feldformenden Elemente nur noch einen Abstand von rd. einem bis einem halben Objektdurchmesser vom Objekt 23 entfernt sind. Die Querdimensionen werden so gewählt, daß sich spitzenförmige Strukturen ergeben, die wesentlich dünner als die charakteristische Objektdimension sind.

Die feldformenden Elemente 25, 26 verursachen eine hohe Feldlinienkonzentration und somit hohe Feldstärken in lokal eng begrenzten Bereichen. Damit ergibt sich auch im Medium eine Feldlinienbündelung und somit ein dielektrischer Durchschlag an bestimmten Orten auf der Oberfläche des Objekts 23. Die örtliche Verteilung der Durchschläge entspricht der Verteilung der feldformenden Elemente und ergibt ein vorbestimmtes Porationsmuster.

Die Fig. 2A zeigt eine Ausführungsform mit vier Elektroden 21a-21d mit einer räumlichen Anordnung analog zu Fig. 1A. Die Fig. 2B hingegen ist eine Multielektrodenanordnung, die als Durchflußsystem oder als stationäres System mit einem geschlossenen Feldkäfig betrieben werden kann. Es ist möglich, daß jedes der feldformenden Elemente 25a-25j, 26a-26j gemäß Fig. 2B eine separate Elektrode mit einer eigenen elektrischen Steuerleitung darstellt. Erfindungsgemäß ist es nicht zwingend erforderlich, daß die Elektroden die genannte Doppelfunktion erfüllen. Sind beispielsweise viele, fein strukturierte feldformende Elemente für die Elektroporation gemäß Fig. 2B vorgesehen, so ist es möglich, daß diese Spitzenelektroden bei Ansteuerung mit einer Hochfrequenz-Spannung keine genügenden Feldkräfte aufbringen, um das zu behandelnde Objekt im interessierenden Bereich zu positionieren oder zu fokussieren. In diesem Fall können gesonderte (nicht dargestellte) Elektroden zur Erzeugung geeigneter Feldbarrieren vorgesehen sein.

Zur Erhöhung der lokalen Feldlinienkonzentration können an den kanalseitigen Enden der feldformenden Elemente zusätzlich (nicht dargestellte) Spitzen- oder Kantenstrukturen vorgesehen sein.

Fig. 3 zeigt eine weitere Ausführungsform mit planaren oder scheibenförmigen Elektroden 31, 32, zwischen denen das Objekt 33 mit einem Durchflußsystem hindurchgeführt wird. Diese Ausführungsform ist somit eine Zwei-Elektrodenanordnung, bei der wieder die Elektroden eine Doppelfunktion in Bezug auf die Dielektrophorese und die Elektroporation erfüllen. Jede der Elektroden 31, 32 besitzt eine innere sternförmige Ausnehmung, so daß das Elektrodenmaterial Spitzen 34 bildet, die analog zu den feldformenden Elementen 25, 26 in den Fign. 2A, 2B Feldlinienkonzentrationen und somit ein bestimmter Porationsmuster auf dem Objekt 33 ergeben, sobald die Durchschlagsspannung erreicht ist.

Die Fign. 4 und 5 illustrieren die feldformende Wirkung der Elektroden bzw. der feldformenden Elemente bei erfindungsgemäßen Vorrichtungen. Fig. 4a zeigt den Feldlinienverlauf in der Nähe und durch eine biologische Zelle 43 bei niedriger Außenleitfähigkeit, wie er beispielsweise bei herkömmlichen Permeationsanordnungen gegeben ist. Fig. 4b zeigt die Situation bei hoher Außenleitfähigkeit. Die bei niedriger Außenleitfähigkeit auftretende Bündelung der Feldlinien 41 im Bereich 43a, 43b der Oberfläche des Objekts 43 kann bei höher leitender Außenlösung nicht erreicht werden, da die Feldlinien 41 das Objekt 43 vorrangig umfließen und weniger durchsetzen. Wird hingegen gemäß Fig. 5 das Ende der Elektrode bzw. des feldformenden Elements 51 mit möglichst geringer Querdimension (d.h. möglichst spitz, Krümmungsradius \ll Objektradius) nahe an die Objektoberfläche (z.B. Oberfläche einer biologischen Zelle) 53 angeordnet, so können auch in hoch leitfähigen Außenlösungen (physiologische Kulturmedien) genügend hohe Feldstärken

für die Elektroporation erzielt werden. Der Abstand der Spitze der Elektrode 51 von der Objektoberfläche beträgt vorzugsweise weniger als ein Objektdurchmesser. Die Feldlinien 52 zeigen den Bereich des dielektrischen Durchbruchs durch die Membran oder Oberfläche des Objekts 53.

Eine andere Gestaltung feldformender Elemente ist in Fig. 6 illustriert. Bei diesem Elektrodensystem sind zwei Elektroden 61, 62 in planarer, flächiger Gestaltung vorgesehen. Die feldformenden Elemente werden durch Isolationsschichten 65 auf jeder der Elektroden auf der dem Kanal bzw. den Objekten zugewandten Seiten gebildet. Die Isolationsschichten 65 besitzen an vorbestimmten Positionen Ausnehmungen oder Öffnungen 64, an denen die metallische Elektrodenfläche (dunkel dargestellt) mit dem Medium in Berührung kommt. Die Ausnehmungen 64 können in vorbestimmter Weise mit den verschiedensten Öffnungsformen mit eckigen, kurvenförmigen oder langgestreckten Umhüllungen vorgesehen sein. Die Elektroden 61, 62 sind auf Substraten (nicht dargestellt) mit den Methoden der Halbleitertechnologie prozessiert. Als Substratmaterial kommt hier wie bei den anderen Ausführungsformen neben Halbleitermaterial (z.B. Silizium) auch Glas, Kunststoff, Keramik oder dgl. in Frage. Das Bezugszeichen 63 bezeichnet das Objekt, das im Kanal zwischen den Elektroden 61, 62 hindurchgeführt oder hindurchgeströmt wird.

Die Ausnehmungen 64 bewirken analog zur Funktion der feldformenden Elemente in Spitzenform eine Konzentration der Feldlinien, so daß sich eine Permeation des Objekts 63 an bestimmten Stellen ergibt bzw. das vorbestimmte Porationsmuster ergibt.

Ein besonderer Vorteil der Ausführungsform gemäß Fig. 6 besteht darin, daß Belastungen des Elektrodenmaterials durch relativ hohe Pulsspannungen verringert werden. Die Pulsspannungen können hier wie bei den anderen Ausführungsformen im Bereich von 1 V bis zu einigen 100 V liegen.

Gegenstand der Erfindung ist auch die Kombination eines miniaturisierten Elektroporationssystems gemäß einer der oben erläuterten Ausführungsformen mit einem miniaturisierten Objektmanipulator und/oder -detektor, wobei eine Elektroporation der Objekte nur an vorbestimmten Objekten oder entsprechend vorbestimmter Zeitmuster vorgenommen wird. Ein derartiges System kann anwendungsabhängig analog zu den in Fig. 7 gezeigten Grundstrukturen gestaltet sein.

Fig. 7 ist eine schematische Draufsicht auf ein miniaturisiertes Mehrkanalsystem, bei dem zwei Kanäle 71, 72 vorgesehen sind, die von Randelementen 73a begrenzt und durch Trennelemente 73b (Spacer) getrennt sind. Die Kanäle 71, 72 werden in Pfeilrichtung von einem Medium durchströmt.

Das Mikrosystem umfaßt einen Manipulationsbereich A und einen Elektroporationsbereich B. Im Manipulationsbereich A erfolgt eine Trennung einströmender Objekte und/oder eine Detektion. Beim dargestellten Beispiel ist im Manipulationsbereich A ein Paar von Ablenkelektroden 76 vorgesehen, die sich im Kanal 71 schräg zur Strömungsrichtung erstrecken. Die Ablenkelektroden umfassen eine untere Elektrode am Kanalboden (nicht dargestellt bzw. verdeckt) und eine obere Elektrode an der oberen Kanalbegrenzung. Zwischen den Elektroden kann das Medium frei durchströmen, wobei jedoch bei Beaufschlagung mit einem hochfrequenten Wechselfeld eine elektrische Feldbarriere aufgebaut wird, die sich im Kanal 71 schräg zur Strömungsrichtung erstreckt.

Die dielektrophoretischen Kräfte sind abhängig vom Objektvolumen. Bei biologischen Objekten werden zur Vermeidung von Membranvorschädigungen Wechselfelder mit Frequenzen oberhalb von 10 MHz verwendet. Beim dargestellten Beispiel erfolgt ein Einströmen eines Zellgemisches bestehend aus großen Zellen 74 und

kleinen Zellen 75. Die Spannung zwischen den Ablenkelektroden wird derart gewählt, daß auf die großen Zellen 74 eine genügend große dielektrophoretische Abstoßungskraft wirkt, so daß diese entlang der Erstreckungsrichtung der Ablenkelektroden durch eine Öffnung zwischen den Trennelementen 73b in den zweiten Kanal 72 überführt werden. Die kleinen Zellen 75 hingegen können die Feldbarriere zwischen den Ablenkelektroden 76 passieren und bleiben im ersten Kanal 71.

Stromabwärts in den Kanälen sind Detektoren 78 vorgesehen. Falls an diesen der Vorbeitritt von Zellen z.B. elektrisch oder optisch detektiert wird (z.B. durch eine Widerstandsmessung oder mittels Photodioden), so wird unter Berücksichtigung der Strömungsgeschwindigkeit mit einer bestimmten Verzögerungszeit im Elektroporationsbereich B die Elektroporation mit den Elektroden 77, 77a ausgelöst. Die Porationsparameter und die Elektrodengröße ist dabei an die getrennten Zellgrößen angepaßt. Bei den Elektroden 77, 77a handelt es sich vorzugsweise um dreidimensionale Elektrodenanordnungen, wie sie beispielhaft oben erläutert wurde. Die Elektroden sind wiederum am Boden bzw. Deckel des Kanals 71 oder 72 angebracht. Das Auslösen eines Fusions- oder Porationspulses kann rechnergestützt oder durch einen detektorgekoppelten Schalter erfolgen.

Nach der Permeation können die permeierten Zellen 79, 80 gegebenenfalls dielektrisch gesammelt und fusioniert werden, wobei wiederum Ablenkelektroden benutzt werden.

Das in Fig. 7 beispielhaft gezeigte System läßt sich anwendungsabhängig beliebig auf mehr Kanäle, komplexere Ablenktechniken und Elektroporationen an mehreren Stufen erweitern.

Fig. 8 zeigt ein weiteres Beispiel eines Mikrosystems, das zur mehrstufigen oder kontinuierlichen Permeation ohne zusätzliche Sensoreinrichtungen eingerichtet ist. Beim Mikrosystem gemäß

Fig. 8 führt ein Kanal 80 zwischen zwei Begrenzungen 81 eine Strömung eines Mediums mit den Objekten 83. Seitlich an den Kanalbegrenzungen 81 sind Elektroden 82 angebracht, die zur Elektroporation eingerichtet sind. Die Elektroden 82 sind über elektrische Steuerleitungen 85 ansteuerbar, die Schaltelemente 84 zum gezielten Betätigen einzelner Elektroden 82 aufweisen. Die Länge der Einzelelektroden bzw. Elektrodenkombinationen in Kanallängsrichtung, die Strömungsgeschwindigkeit und die gewünschte Porationspulslänge und -wiederholddauer erlauben eine kontinuierliche Permeation der Objekte während des Durchtritts durch den Kanal. Bei Elektroden mit einer Länge von z.B. 1 mm und einer Strömungsgeschwindigkeit von 1 mm/s ist sichergestellt, daß bei einer Pulsperiode von 1 s jede Zelle pro Periode einen Puls erfährt. Der Einsatz einer Vielzahl von Einzelelektroden anstelle einer sich lang erstreckenden, einheitlichen Elektrode besitzt den Vorteil, daß an einer integralen Elektrode Spannungsverluste und Erwärmungen auftreten würden, die die Elektroporation nachteilig beeinflussen könnten.

Der Aufbau der Fokussierungs- und Porationselektroden aus Einzelelektroden gemäß Fig. 8 ermöglicht die Realisierung des folgenden Ansteuerprotokolls. Die Elektroporation basiert auf der Wirkung eines Gleichspannungspulses auf die zu behandelnden Objekte. In der Suspensionslösung ergibt sich während des Gleichspannungspulses an den beteiligten Elektroden eine Ansäuerung bzw. eine Alkalisierung in Elektrodennähe. Um diese pH-Änderungen möglichst gering zu halten, ist erfindungsgemäß vorgesehen, jeweils benachbarte Einzelelektroden mit umgekehrter Feldrichtung zu betreiben, so daß sich Elektroden mit Ansäuerungs- und Alkalisierungserscheinungen abwechseln. Des weiteren kann insbesondere bei einer Anordnung gemäß Fig. 8 vorgesehen sein, daß zunächst ein Einströmen einer Zellgruppe in den Kanal und ein Positionieren der Zellen zwischen den Elektroden erfolgt. Die Zellen werden mit dielektrophoretischen

schen Kräften in Position zwischen den Elektroden gehalten. Anschließend folgt der eigentliche Elektroporationsschritt. Dabei werden aufeinanderfolgend zuerst die am weitesten stromabwärts gelegene Elektrode und anschließend schrittweise jede weitere stromaufwärts gelegene Elektrode mit dem Gleichspannungspuls zur Elektroporation beaufschlagt. Dieses Verfahren hat den Vorteil, daß die Ansäuerungs- und Alkalisierungserzeugnisse im Suspensionsstrom, der den Kanal durchsetzt, laufend abtransportiert werden, wobei die einzelnen Elektroporationsvorgänge jeweils unter den ursprünglich in der Suspension eingestellten Bedingungen erfolgt.

Fig. 9 zeigt Abwandlungen der Elektrodenanordnung gemäß Fig. 8. Von den dreidimensionalen Elektrodensystemen ist jeweils nur eine Ebene dargestellt. Vorzugsweise wird die zweite Ebene sandwichartig spiegelsymmetrisch über der ersten Ebene angebracht. Die geraden Elektroden 91A parallel zum Kanal besitzen den Vorteil, daß das Feld eine gleichbleibende Feldstärke besitzt. Die Kontakte zu den Subelektroden können über Schaltelemente 91A1 extern gesteuert werden. Alternativ können Kurvenformen 91B (Dreiecksform, Sinusform oder sogenannte "castellated" Form) für bestimmte Zelltypen durch Variation der Feldstärke bevorzugt sein. Segmentierte Einzelelektroden sollten derart dimensioniert sein, daß die Einzelsegmente eine Länge von rd. 100 µm in Kanalrichtung besitzen.

Fig. 10 illustriert die Prinzipien der Kombination von Manipulations- und Elektroporationsbereichen. So können entweder zwei getrennte Strukturen 101A oder eine gemeinsame Struktur 101B benutzt werden. Im Manipulationsbereich ("Sammeln") erfolgt eine Beaufschlagung der Elektroden mit dem Hochfrequenzfeld zur Ausbildung von Feldbarrieren, die die Objekte in den Porationsbereich zusammenführen. Es ist nicht erforderlich, daß das Hochfrequenzfeld für die Dielektrophorese laufend angeschaltet ist. Es ist vielmehr möglich, daß die Dielektropho-

rese beim Durchtritt eines Objekts aktiviert und dazu zeitlich verzögert (rd. 1 ms) die Elektroporation durchgeführt wird. Die Verzögerung hängt je nach Anwendungsfall von der Strömungsgeschwindigkeit im Kanal ab. Für Puls- bzw. HF-Generatoren für die Elektroporation bzw. die Dielektrophorese ist vorzugsweise eine gemeinsame Massenverbindung vorgesehen.

Eine weitere Abwandlung gegenüber der Anordnung 101B in Fig. 10 ist in Fig. 11 gezeigt. Die Elektrodenstruktur 111 verjüngt sich in Bewegungsrichtung der Teilchen bzw. in Strömungsrichtung im Kanal von einem größeren Abstand der Teilelektroden hin zu einem geringeren Abstand der Teilelektroden. Eine derartige Gestaltung erlaubt es, verschieden große Teilchen an verschiedenen Orten zu behandeln, nämlich das kleinere Teilchen 113A weiter stromabwärts als das größere Teilchen 113B.

Erfindungsgemäß kann eine Elektroporations- oder Fusionsvorrichtung mit einer Einrichtung zur visuellen Beobachtung der Objekte im Kanal bzw. des Ergebnisses der elektrischen Behandlung der Objekte ausgestattet sein. Diese Vorrichtung ist vorzugsweise ein Mikroskop. Ein besonderer Vorteil der Erfindung besteht darin, daß die Anordnung bandförmiger Fokussierungs- und Porationselektroden bei Aufbau des Mikrosystems mit zumindest abschnittsweise transparenten Wänden einen direkten Einblick in den Kanal, insbesondere in den Bereich des Feldminimums zwischen den Elektroden, erlaubt.

PATENTANSPRÜCHE

1. Vorrichtung zur Elektroporations- und/oder Fusionsbehandlung mikroskopischer Objekte in einem Mikrosystem, die eine Kanalstruktur zum Durchfluß eines Mediums, in dem die Objekte suspendiert sind, und mindestens zwei miniaturisierte Elektroden umfaßt, die an den Wänden der Kanalstruktur angeordnet und dazu eingerichtet sind, die Objekte in der Kanalstruktur mit Abstand von deren Wänden und den Elektroden zu halten und mit elektrischen Spannungen zur Elektroporations- und/oder Fusionsbehandlung zu beaufschlagen.
2. Vorrichtung gemäß Anspruch 1, bei der die Elektroden Hochfrequenzelektroden zur Positionierung der Objekte in der Kanalstruktur und Pulselektroden zur Elektroporation und/oder Fusion der Objekte umfassen.
3. Vorrichtung gemäß Anspruch 2, bei der die Hochfrequenzelektroden und die Pulselektroden durch getrennte Elektrodenelemente oder durch zumindest teilweise verbundene Elektrodenelemente oder gemeinsam durch identische Elektrodenelemente gebildet werden.
4. Vorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei der die Pulselektroden feldformende Einrichtungen zur Erzeugung eines Porations- und/oder Fusionsmusters aufweisen.
5. Vorrichtung gemäß Anspruch 4, bei der die feldformenden Einrichtungen durch Spitzenelektroden oder Abschirmelemente mit geeigneten Durchtrittsöffnungen gebildet werden, wobei die durch die Spitzenelektroden oder die Abschirmelemente gebildeten wirksamen Elektrodenflächen eine Dimension besitzen, die

wesentlich kleiner als eine charakteristische Dimension des jeweils zu behandelnden Objekts ist.

6. Vorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei der die Objekte von den Pulselektroden einen Abstand besitzen, der geringer als eine charakteristische Objektdimension ist.

7. Vorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei der in der Kanalstruktur in Durchflußrichtung des Mediums eine Vielzahl von Pulselektroden angeordnet sind.

8. Vorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Kanalstruktur eine Vielzahl von Kanälen jeweils mit miniaturisierten Elektroden umfaßt, die zum gleichzeitigen Durchfluß des Suspensionsmediums mit den zu behandelnden Objekten eingerichtet sind.

9. Elektroporationsgerät, das mit einer Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 ausgerüstet ist.

10. Elektrofusionsgerät, das mit einer Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 ausgerüstet ist.

11. Gerät gemäß Anspruch 9 oder 10, das als Mikrosystem mit einer Multielektrodenanordnung gestaltet ist.

12. Gerät gemäß Anspruch 11, bei dem das Mikrosystem charakteristische Dimensionen der Elektroden im Bereich von 100 µm oder geringer und charakteristische Dimensionen der Elektrodenabstände im Bereich von einigen Durchmessern biologischer Zellen besitzt.

13. Verfahren zur Elektroporation und/oder Fusion mikroskopischer Objekte, bei dem die Objekte frei suspendiert mit einem Medium durch eine Kanalstruktur eines Mikrosystems berührungs-

los an mindestens zwei Elektroden vorbeigeführt werden, die zur Elektroporation und/oder Fusion eingerichtet sind, und die Elektroden mit vorbestimmten Spannungen zur Elektroporation und/oder Fusion der Objekte beaufschlagt werden.

14. Verfahren gemäß Anspruch 13, bei dem die Objekte in der Kanalstruktur mit Hochfrequenzelektroden auf der Grundlage negativer Dielektrophorese in einem sich in Kanallängsrichtung erstreckenden elektrischen Feldminimum positioniert oder geführt werden.

15. Verfahren gemäß Anspruch 13 oder 14, bei dem die Objekte während der Elektroporation bzw. Fusion durch die Kanalstruktur strömen.

16. Verfahren gemäß Anspruch 13 oder 14, bei dem die Objekte während der Elektroporation bzw. Fusion in der Kanalstruktur festgehalten werden.

17. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 13 bis 16, bei dem vor der Elektroporation bzw. Fusion eine Erfassung von Objekteigenschaften und/oder eine Trennung von Objekten mit verschiedenen Eigenschaften erfolgt.

18. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 13 bis 17, bei dem die Objekte biologische Objekte, insbesondere Zellen, oder synthetische, membranumhüllte Gebilde, insbesondere Liposomen oder Vesikeln, umfassen.

1/8

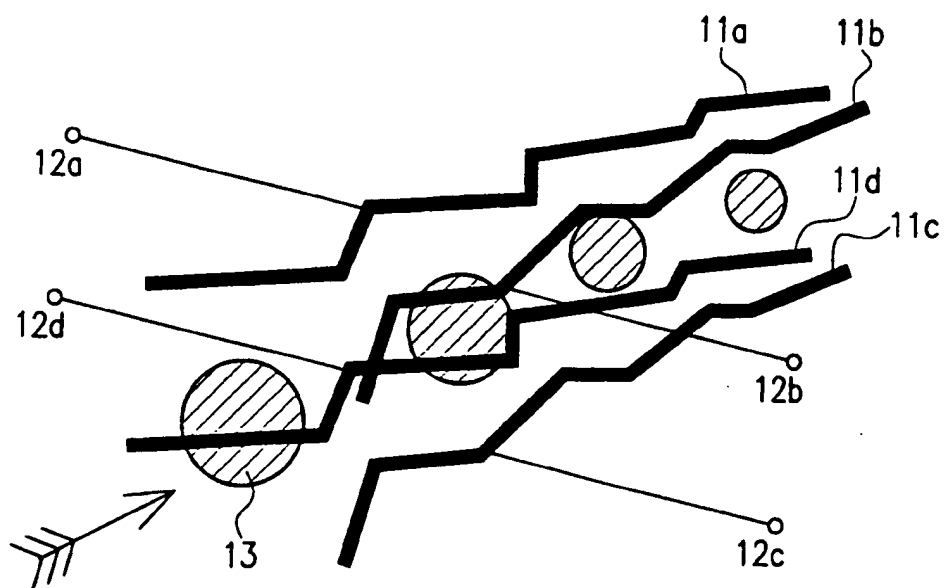


FIG. 1(A)

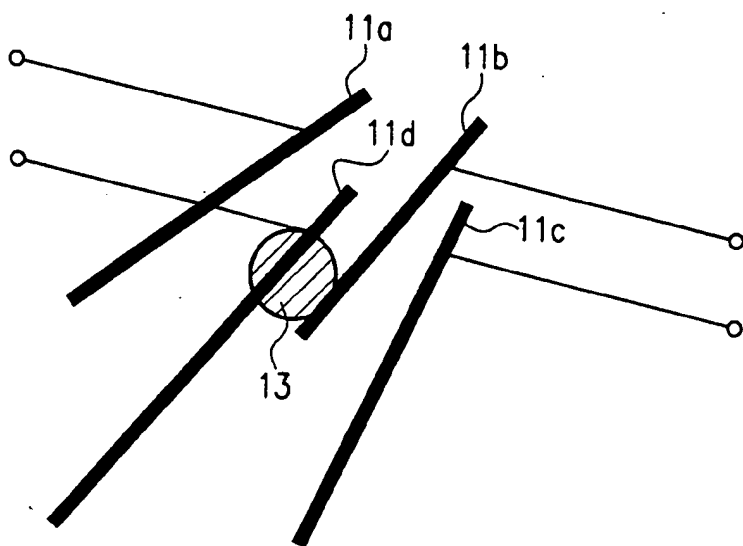


FIG. 1(B)

2/8

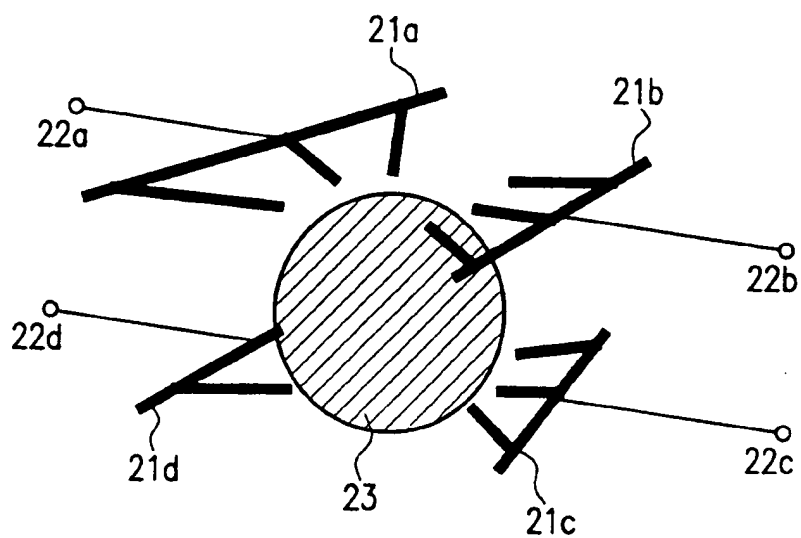


FIG. 2(A)

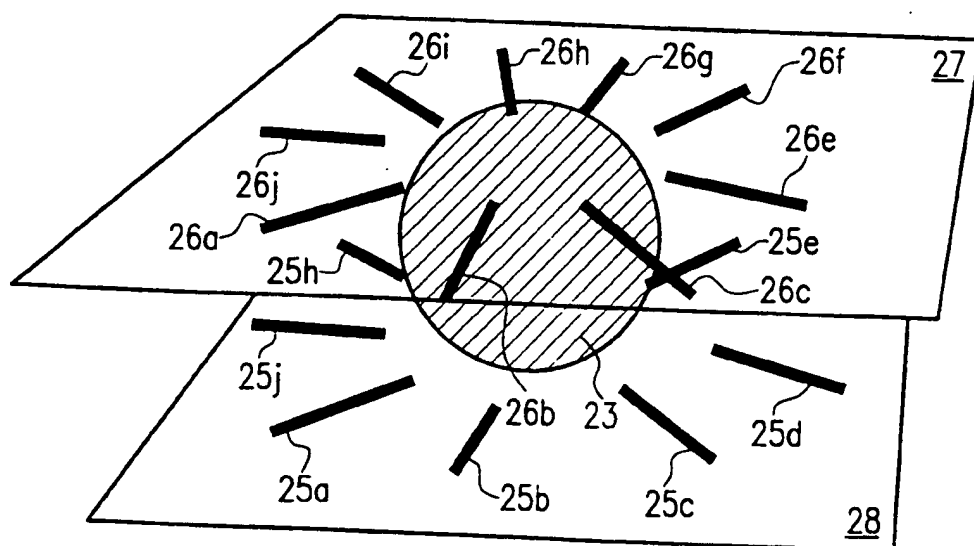


FIG. 2(B)

3/8

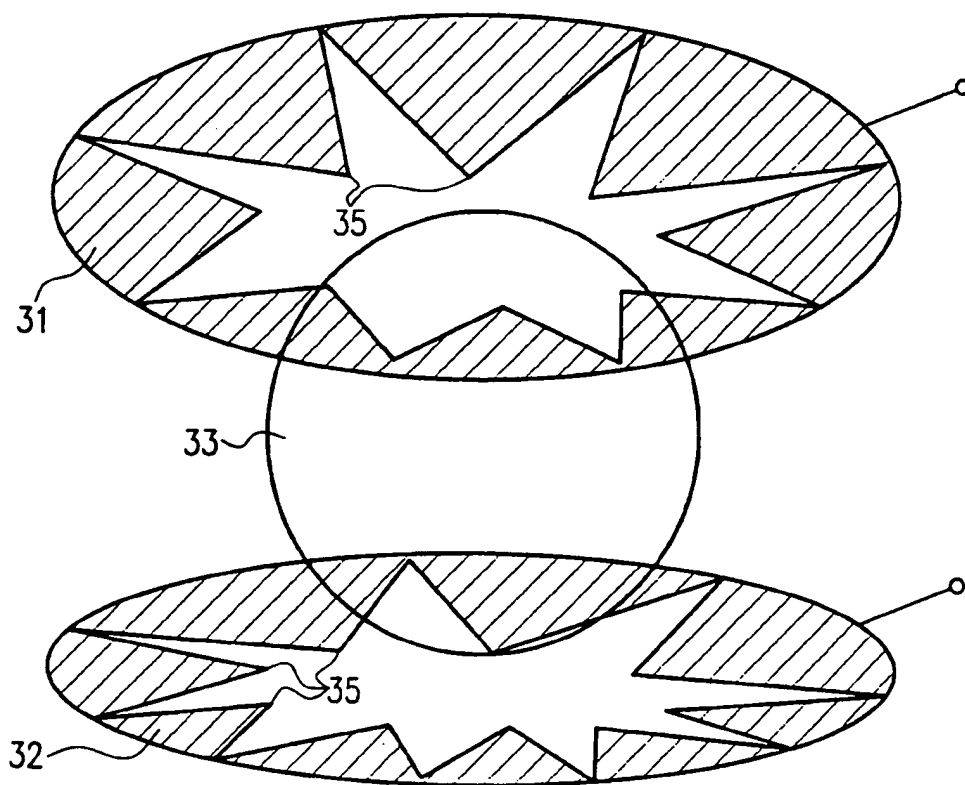


FIG.3

4/8

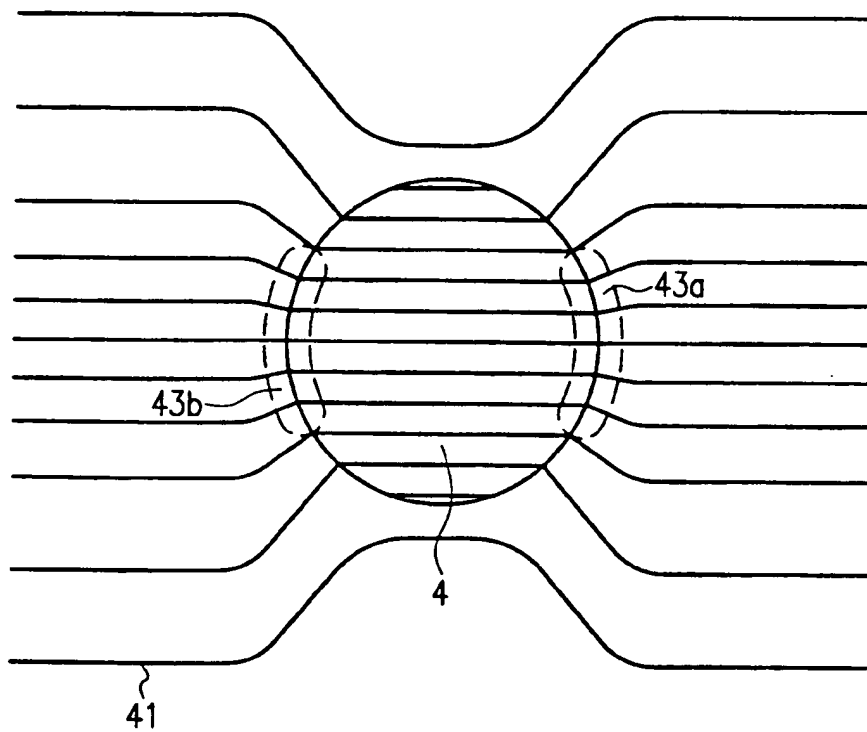


FIG. 4(A)

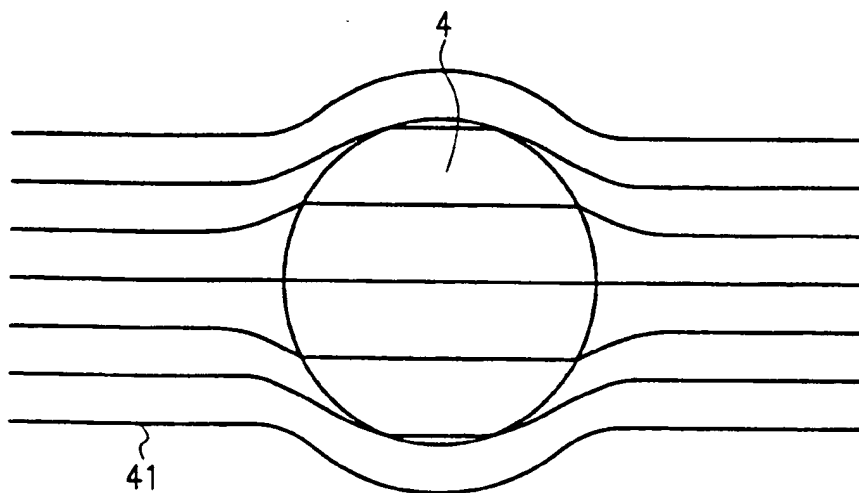


FIG. 4(B)

5/8

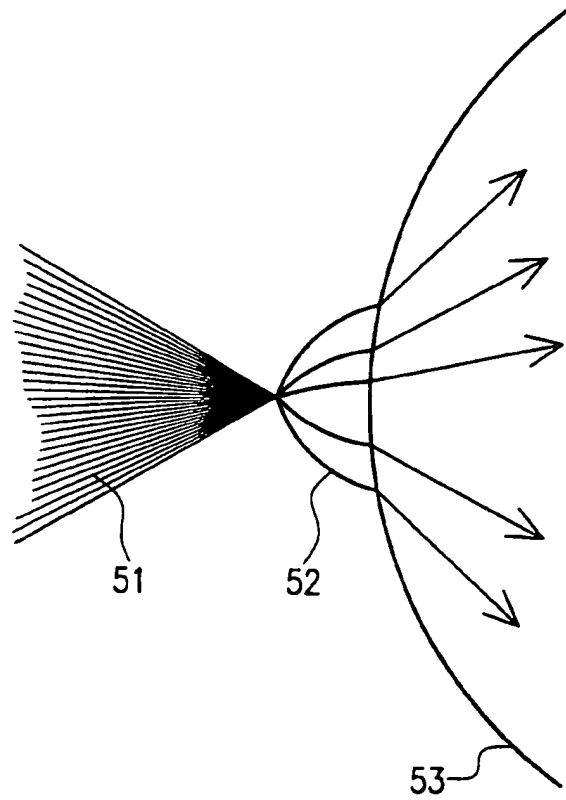


FIG. 5

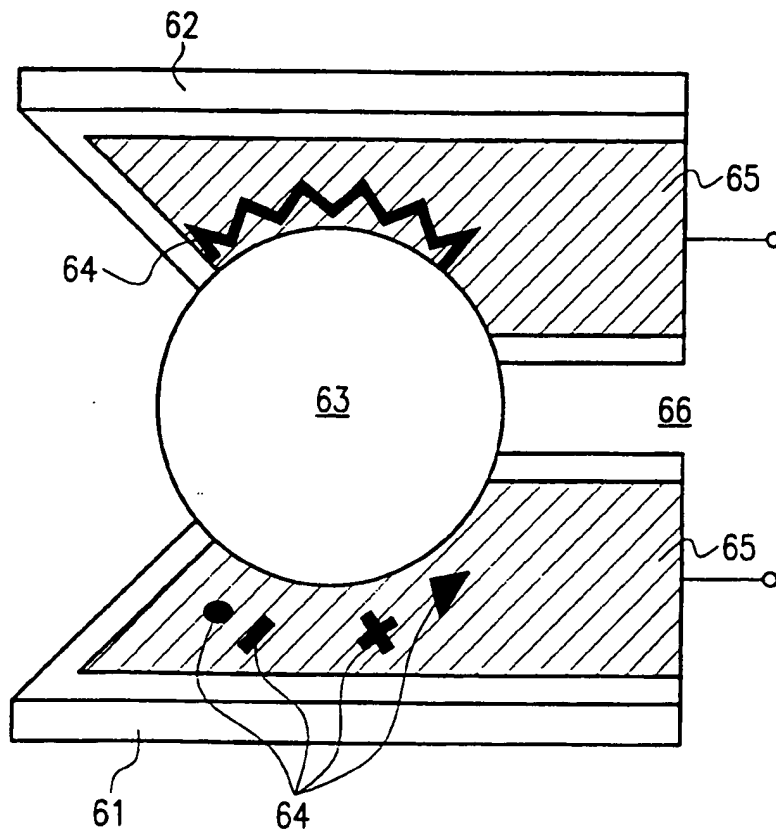
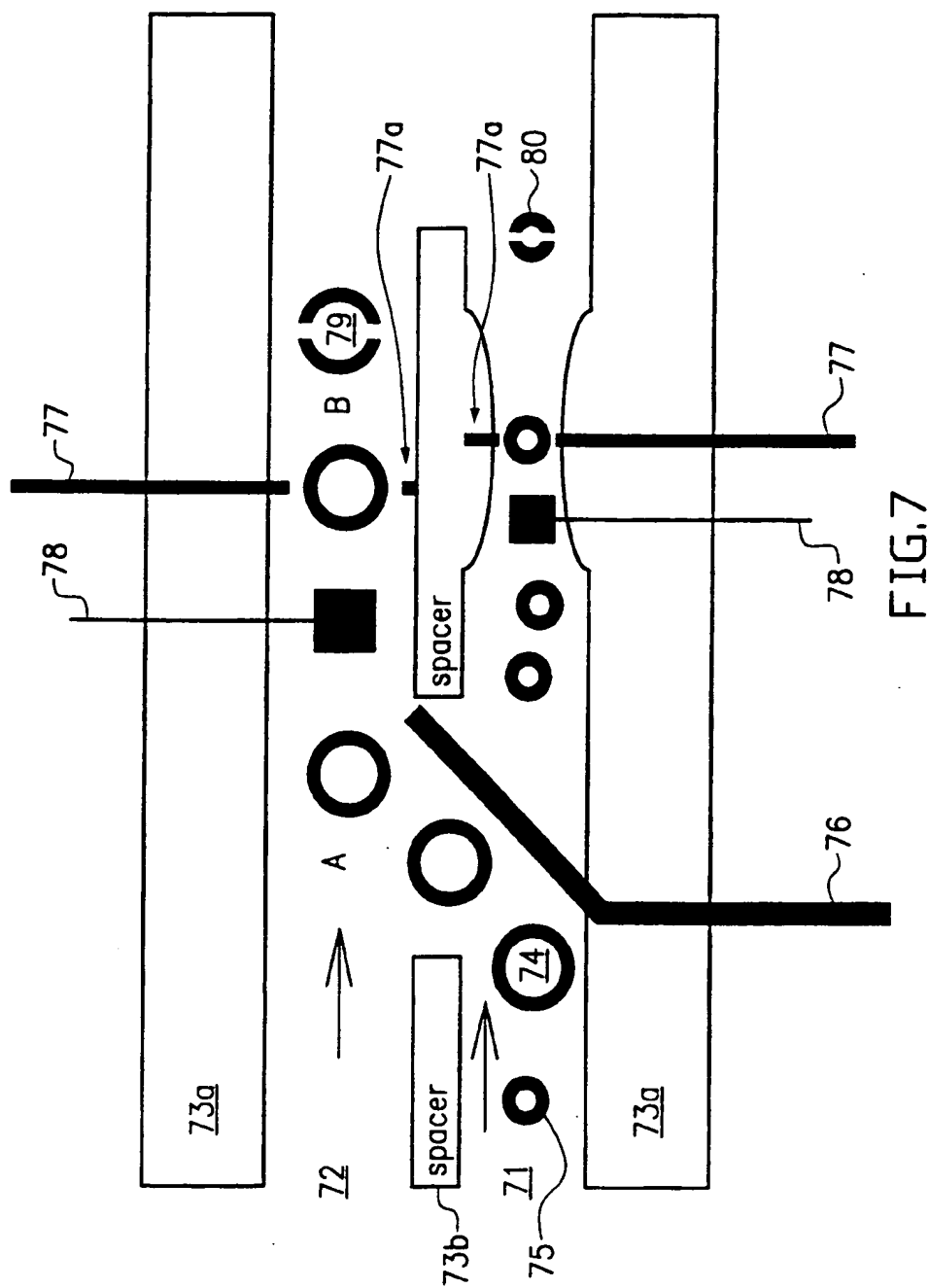


FIG. 6



7/8

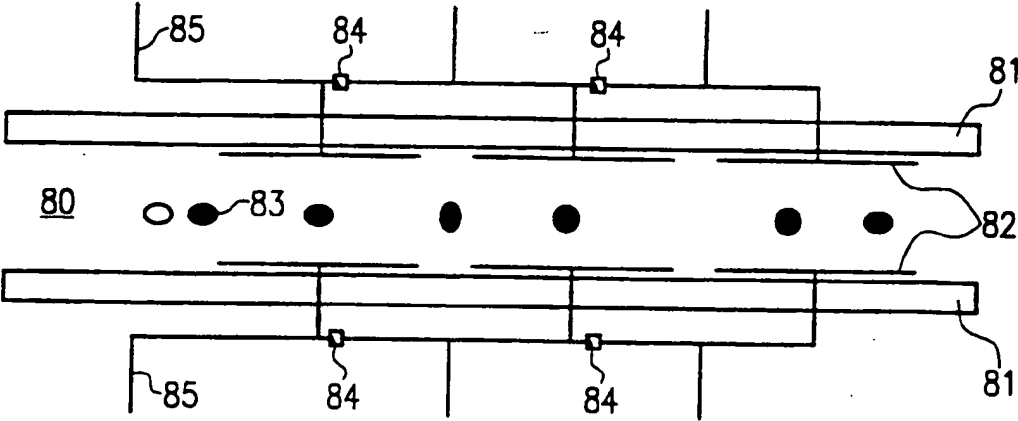


FIG.8

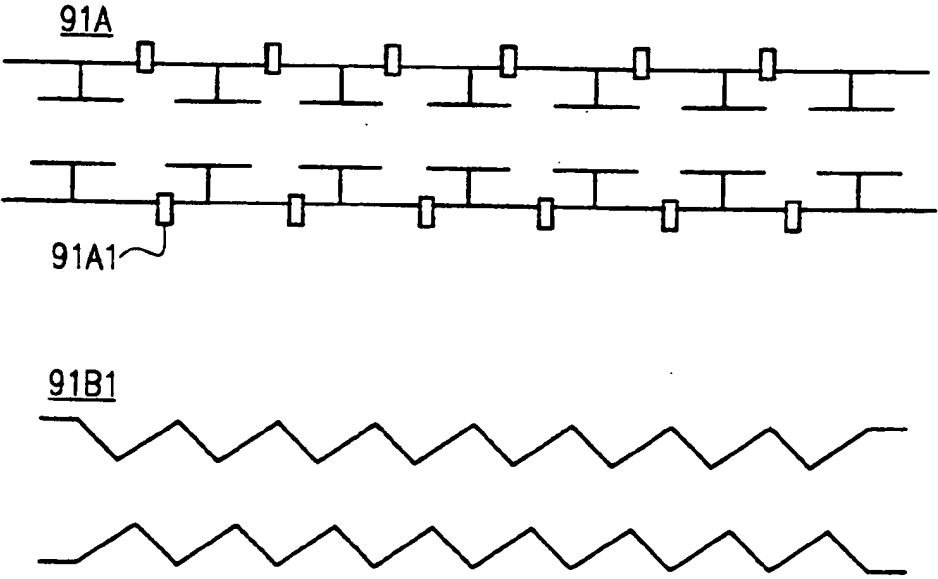


FIG.9

8/8

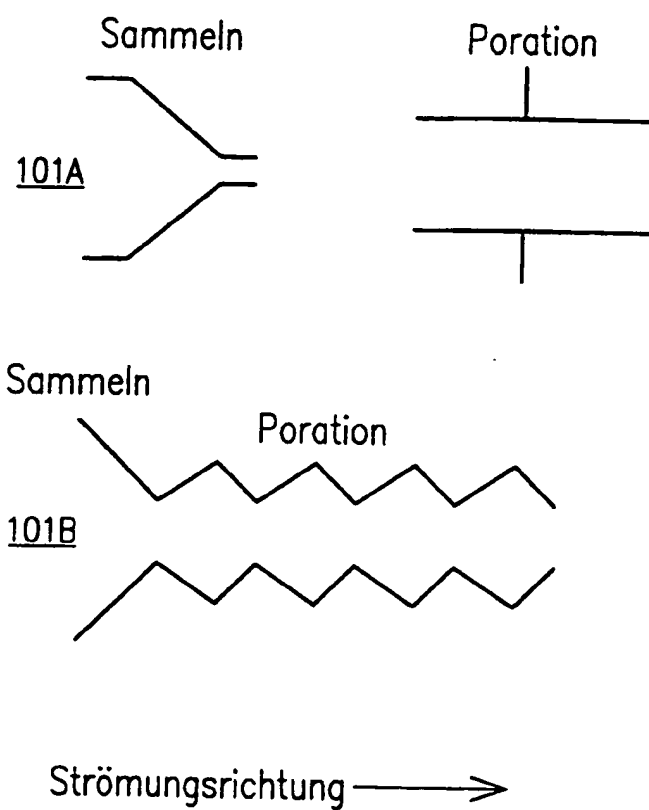


FIG.10

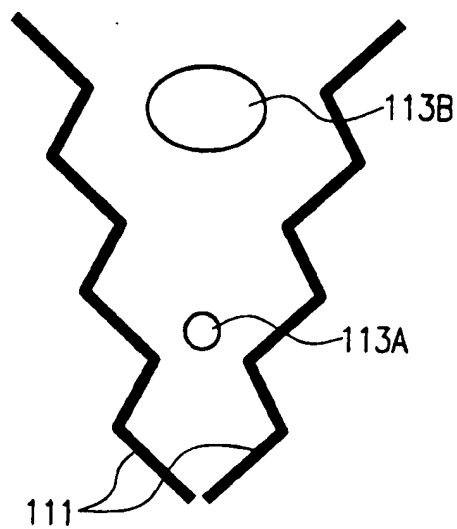


FIG.11